

09/202464 3
PCT/JP97/02031
2003.97

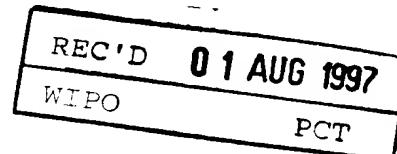
日本特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1996年 6月14日



出願番号
Application Number:

平成 8年特許願第153527号

出願人
Applicant(s):

明治乳業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年 7月10日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光

出証番号 出証特平09-3056391

【書類名】 特許願

【整理番号】 M1-805

【提出日】 平成 8年 6月14日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 13/00

【発明の名称】 T細胞エピトープペプチド

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 540 番地 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所内

【氏名】 紀 光助

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 540 番地 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所内

【氏名】 大力 一雄

【特許出願人】

【識別番号】 000006138

【氏名又は名称】 明治乳業株式会社

【代表者】 中山 悠

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

特平 8-153527

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9600629

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 T細胞エピトープペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1の少なくとも一つのT細胞エピトープを含み、かつ、図4のペプチド番号#1-2、#1-5、#1-6、#1-7、#1-8、#1-10、#1-11、#1-12、#1-14、#1-16、#1-19、#1-20、#1-21、#1-22、#1-24、#1-26、#1-27、#1-32、#1-33及び#1-34で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の一部を有するペプチド。

【請求項 2】 ヒノキ花粉アレルゲンCha o 2の少なくとも一つのT細胞エピトープを含み、かつ、図8のペプチド番号#2-8、#2-9、#2-10、#2-11、#2-13、#2-14、#2-15、#2-16、#2-17、#2-18、#2-19、#2-20、#2-21、#2-22、#2-24、#2-25、#2-26、#2-27、#2-30、#2-31、#2-35、#2-40、#2-41、#2-42、及び#2-43で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の一部を有するペプチド。

【請求項 3】 少なくとも2つ以上のT細胞エピトープを含む、請求項1又は2記載のペプチド。

【請求項 4】 春期樹木花粉症患者由来のT細胞の活性を刺激及び／又は抑制する作用を有し、かつ、請求項1又は2記載のペプチドのアミノ酸配列が、置換、欠失または挿入されたアミノ酸配列を有するペプチド。

【請求項 5】 請求項1～4に記載のペプチドを有効成分とする、春期樹木花粉症に対するペプチド免疫療法用組成物。

【請求項 6】 請求項1～4に記載のペプチドを有効成分とする、春期樹木花粉症の診断に用いる試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、花粉アレルゲンのT細胞エピトープペプチド及び当該ペプチドを有効成分とする、春期花粉症に対するペプチド免疫療法用組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

全国民の約10%が苦しめられているスギ花粉を代表とする春期花粉症はさらに増加の傾向にあり、社会的にも注目される疾病の一つとなっている。

【0003】

一般に、花粉症の発症・持続期間は花粉の飛散時期と一致するが、スギ花粉飛散時期が過ぎてもなお症状が持続する例がかなりある。これは、スギ花粉症患者の大多数がヒノキ花粉にも同時に感作されているため、スギ花粉飛散時期に遅れて飛散するヒノキ花粉にも反応して有症期間が長く続くためとされている。

【0004】

すなわち、スギとヒノキ花粉は共通の抗原性を持ち（井出武等、アレルギー臨床11、174-178、1991）、IgE抗体に対するスギ、ヒノキ間の交差反応性が示されており（Taniai M. et al.: Mol. Immunol. 30, 183-189, 1993）、春期花粉症患者のアレルゲン特異的IgE抗体陽性率はスギが83.5%、ヒノキが80.0%、スギ・ヒノキ両者が76.4%であり（岡野光博等、アレルギー43、1179-1184、1994）、スギ花粉症患者の60%がヒノキ花粉特異的IgE抗体を保有している（斎藤洋三、治療78、1571-1576、1996）、等の報告から、スギ花粉症患者はヒノキ花粉でも発症し、その逆もあり得ることが、一般的な認識となっている。

【0005】

花粉症に対する予防・治療法としては、花粉症が花粉アレルゲン（アレルギーを引き起こす抗原のことで、本質的に抗原と同じ）と、それに特異的なIgE抗体との抗原抗体反応から引き起こされる即時型の典型的なI型アレルギーであることから、I型アレルギーの発症メカニズムに理論的に対応した予防・治療法が行われている。

【0006】

I型アレルギーの発症メカニズムの概要是以下の通りである。

【0007】

体内に侵入した抗原は、抗原提示細胞によりヘルパーT細胞に抗原提示され、その結果、B細胞が成熟して抗体産生細胞となり、抗原特異的IgE抗体を産生する。このIgE抗体は、肥満細胞表面に結合する。次に新たに抗原が入ってくると、

抗原は肥満細胞表面のIgE抗体に結合し、その刺激で、肥満細胞からヒスタミンなどの化学伝達物質が放出され、アレルギー症状を引き起こす。

【0008】

アレルギー症状に至るこれらの経過に対応した予防・治療法として、1)アレルギー発症の原因となる抗原の回避、2)抗ヒスタミンに代表される薬物療法、3)アレルゲンによる減感作療法、の3つの主要な予防・治療法が用いられている。しかしながら、1)は現実には実施困難であり、2)はあくまでも対症療法であり、3)は唯一アレルギーの根本治療を期待できるが、効果の点で確実性に欠け、アナフィラキシーなどの重大な副作用を伴う危険性がある。

【0009】

このようなことから、最近アレルゲンのT細胞エピトープペプチドを用いたペプチド免疫療法が、アレルギーの予防・治療に試みられるようになってきている。

T細胞エピトープは、アレルギーの臨床症状の原因となるタンパク質アレルゲンに対する免疫応答の開始及び持続に関与する。これらのT細胞エピトープは、抗原提示細胞表面のHLAクラスII分子に結合して関連T細胞サブポピュレーションを刺激することにより、ヘルパーT細胞のレベルで初期事象の引き金を引くと考えられる。この初期事象は、T細胞増殖、リンホカイン分泌、局所性炎症反応、増殖した免疫細胞の炎症部位への移動及び抗体産生へ導くB細胞カスケードへの活性化を引き起こす。これらの抗体のイソ型であるIgE抗体は、アレルギー発症・持続に基本的に重要であり、その産生は上記カスケードの初期に、ヘルパーT細胞のレベルで分泌されたリンホカインの性質により影響を受ける。T細胞エピトープは、T細胞レセプターによる認識の基本要素又は最小単位であり、このエピトープはレセプターを認識する必須のアミノ酸を含んでいる。T細胞エピトープペプチドを用いて、免疫抑制の要であるヘルパーT細胞の応答を制御することはアレルギー炎症の治療につながると考えられる。

【0010】

例えば、T細胞エピトープペプチドを用いたアレルギーの治療剤として、ネコのアレルゲンのT細胞エピトープを含む治療用組成物（特表平7-505365号公報）

、スギ花粉Cry j 1のT細胞エピトープペプチドを用いた治療組成物（特表平8-502163号公報）、スギ花粉アレルゲンCry j 1とCry j 2のT細胞エピトープをつなぎた多重重エピトープペプチド（特願平8-80702号）等がある。ヒノキ花粉については、その主アレルゲンCha o 1が分子量45KDと50KDであり、等電点がいずれも6.8であり、5%の糖を含むタンパクからなるとの報告（井出武他：日本花粉学会誌、34、39、1988）はあるが、その一次構造は不明であり、そのため、アレルゲン分子上のT細胞エピトープ部位も同定されていない。最近、本発明者らは、ヒノキ花粉アレルゲンの遺伝子クローニングに成功し、当該アレルゲンにはCha o 1の他にCha o 2が存在することを明らかにし、Cha o 1とCha o 2それぞれの一次構造を決定した（特願平6-335089号）。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

スギとヒノキ花粉の飛散期は一致する時期（混在期間）があり、さらに両者は、共通の抗原性を持つことから、スギ・ヒノキ花粉による症状は明確には区別が付かない。しかし、スギ花粉の飛散期を過ぎてもなお症状が持続したり、新たに症状が発現する例があり、この時期の空中花粉の多くがヒノキ花粉であることから、これらの症状はヒノキ花粉によるものと考えられる。スギよりもヒノキの植林が進められている現状から、ヒノキ花粉の飛散量は年々増加しており、将来はスギ花粉の飛散量を上回ると考えられる。従って、スギ花粉症のみでなく、ヒノキ花粉症も含めた春期樹木花粉症に対する、総合的な根本的予防・治療方法の確立が望まれている。T細胞エピトープペプチドを用いた免疫療法はアレルギーの根本的治療につながると期待され、既にスギ花粉症に対しては上記のように当該免疫療法がいくつか報告されているが、ヒノキ花粉症についての報告及びスギ・ヒノキを含めた春期樹木花粉症についての報告は全くない。

【0012】

このような状況から、本発明は、ヒノキ花粉症に対するペプチド免疫療法に有用なT細胞エピトープペプチドを提供することを課題とする。さらに、本発明は、ヒノキ花粉と交差反応性を持つスギ花粉症患者も含めた春期樹木花粉症患者に対するペプチド免疫療法に有用なT細胞エピトープペプチドを提供することを課

題とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ヒノキ花粉症患者から樹立したT細胞ラインを、ヒノキ花粉アレルゲンの一次構造をカバーする合成オーバーラップペプチドで刺激することにより、ヒノキ花粉アレルゲン分子上のT細胞エピトープ部位を同定し、上記課題を解決した。

【0014】

すなわち、本発明は、具体的には、特許請求の範囲の各請求項に記載された発明からなる。以下本発明を詳細に説明する。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明者らが解明したヒノキ花粉アレルゲンの主要アレルゲンCha o 1（成熟タンパク質）のアミノ酸配列（特願平6-335089号に記載のもの）を配列番号：1に、Cha o 2のアミノ酸配列を配列番号：2にそれぞれ示す。Cha o 1のアミノ酸配列はスギ花粉アレルゲンCry j 1と80%相同であり、Cha o 2は同じくスギ花粉アレルゲンCry j 2と75%相同である。

【0016】

花粉、ダニ、蜂毒由来の個々のアレルゲンには、多数のアミノ酸置換が見出されており、それらは互いにイソアレルゲン（isoallergen）と呼ばれている。例えば、カバの木花粉Bet v 1は、11種類のイソアレルゲンが分離され、互いに2~15%の範囲でアミノ酸配列が異なっている（Swoboda, I. et al.: J. Biol. Chem. 270: 2607-2613, 1995）。又、Cry j 2については、現時点で、成熟タンパク部分で6個のアミノ酸置換が見られる2つのイソアレルゲンが存在する（特開平8-47392、特開平7-170986号公報）。Cha o 1、Cha o 2についても、イソアレルゲンが存在し得ることは当業者には容易に予想されることであり、そのようなイソアレルゲンも、本発明でいうCha o 1、Cha o 2に含まれる。

【0017】

スギ科植物は9属に分類され、ヒノキ科植物は7属に分類されるが、スギ科のス

ギ、セコイア、メタセコイア、ユウヤマキ（独立した科、スギ科、又はマツ科という説がある）とヒノキ科のヒノキ、サワラ、コノテガシワ、ネズミサシ、ビャクエンとの間には、アレルゲンに交差反応性があるとの報告があり（井出武等、アレルギーの臨床11、174-178、1991）、スギアレルゲンとヒノキアレルゲンとは広く交差反応性を有すると考えられる。従って、本発明のペプチドの多くはヒノキ花粉症のみならず、スギ花粉症にも有効であると考えられる。

【0018】

本発明のT細胞エピトープペプチドを得るために、Cha o 1及びCha o 2の一次構造をカバーする適当な長さのアミノ酸（12～20残基）からなるオーバーラップペプチドを合成する。本発明のペプチドは、春期樹木花粉症患者由来のT細胞の活性を刺激及び／又は抑制する作用を有する。即ち、本発明のペプチドは、T細胞増殖又はリンホカイン分泌等のT細胞応答を誘導することができ、及び／又はT細胞アネルギー（不応答）を誘導することができる。T細胞増殖を指標としてアレルゲン分子上のT細胞エピトープ部位を同定する場合は、特開平8-47392号公報に記載の方法に準じて、ヒノキ花粉症患者の末梢血リンパ球からCha o 1及びCha o 2に特異的に反応するT細胞ライン又はT細胞クローンを患者毎に樹立し、当該T細胞ライン又はT細胞クローンを上記オーバーラップペプチドの個々のペプチドの存在下で培養し、ペプチドに対するT細胞増殖、例えば、細胞内への [³H] チミジン取り込みを測定し、刺激係数を算出することにより同定する。ここで用いるT細胞応答の刺激係数（Stimulation Index、SI）は、ペプチド存在下で細胞内へ取り込まれた [³H] チミジンの放射能のcpmを、ペプチド非存在下（対照）のcpmで除したものとして計算される。この結果を用いて、患者群について各ペプチドに対する平均刺激係数を計算する。このようにT細胞応答を誘発し、及び／又はT細胞アネルギーを誘導することが見出されたペプチドを、T細胞刺激活性を有するペプチドと定義する。本発明の好適なT細胞エピトープペプチドは、T細胞刺激活性を有し、従って少なくとも一つのT細胞エピトープを含み、例えば、図1のCha o 1のペプチド（図2、図3に具体的に示す）のうち、ペプチド番号 #1-2、#1-5、#1-6、#1-7、#1-8、#1-10、#1-11、#1-12、#1-14、#1-16、#1-19、#1-20、#1-21、#1-22、#1-24、#1-26、#1-27、#1-32、#1-33及び

#1-34(図4)、或いは図5のCha o 2のペプチド(図6、図7に具体的に示す)のうちペプチド番号#2-8、#2-9、#2-10、#2-11、#2-13、#2-14、#2-15、#2-16、#2-17、#2-18、#2-19、#2-20、#2-21、#2-22、#2-24、#2-25、#2-26、#2-27、#2-30、#2-31、#2-35、#2-40、#2-41、#2-42、及び#2-43(図8)に示されるペプチドを含み、さらに好適なペプチドは平均刺激係数が2.0以上のものを含み、例えば図1のペプチドのうちペプチド番号#1-2、#1-7、#1-8、#1-11、#1-16、#1-20、#1-22、#1-24、#1-26、#1-32、#1-33及び#1-34に示されるペプチド、或いは図5のペプチドのうちペプチド番号#2-10、#2-19、#2-20、#2-21、#2-30、#2-42、#2-43を含む。さらに又、好適なペプチドは、重要度指数が少なくとも100以上のものを含み、例えば図1のペプチドのうちペプチド番号#1-7、#1-8、#1-11、#1-20、#1-22、#1-26、#1-32、#1-33及び#1-34に示されるペプチド、或いは図5のペプチドのうちペプチド番号#2-10、#2-19、#2-20、#2-21、#2-30、#2-42を含む。ここで重要度指数とは、あるペプチドの平均刺激係数に、当該ペプチドにT細胞応答を示す患者の出現頻度(%)を乗じたものである。

【0019】

正確なエピトープを同定するには、T細胞刺激活性を有し、従って少なくとも一つのT細胞エピトープを含むペプチドを、そのペプチドのアミノ末端又はカルボキシ末端何れかのアミノ酸残基の欠失等によって改変し、その改変したペプチドに対するT細胞刺激活性の変化を調べる。又、重複領域を共有する二つ以上のペプチドがT細胞刺激活性を示す場合は、このようなペプチドの全部もしくは一部を含む新たなT細胞エピトープペプチドを作製し、同様にT細胞刺激活性を測定することができる。

【0020】

本発明のT細胞エピトープペプチドは、Cry j 1又はCry j 2とのT細胞交差反応性により免疫学的に関連していると考えられる。すなわち、1)Cha o 1とCry j 1はアミノ酸配列が80%相同であり、Cha o 2とCry j 2は75%相同であること、2)本発明の実施例5で同定されたCha o 1のT細胞エピトープペプチド#1-2(成熟型Cha o 1のアミノ酸配列番号:11~30に対応)と、Cry j 1のT細胞エピトープ

ペプチドCJI-1（成熟型Cry j 1のアミノ酸番号11～30に対応、特表平8-502163号公報／図13）とは、2カ所のアミノ酸を除いてアミノ酸配列が一致していること（Cha o 1の12番目のAlaはCJI-1ではSer、Cha o 1の15番目のAspはCJI-1ではAla）、3)スギとヒノキ花粉は共通の抗原性を持つ。このことから、本発明のT細胞エピトープの由来はヒノキに限定されず、また、本発明のT細胞エピトープはヒノキ花粉症のみならずスギ花粉症にも有効であると考えられる。

【0021】

又、本発明のT細胞エピトープペプチドについて、T細胞レセプターの認識にかかるアミノ酸残基を公知の技術（例えば、当該アミノ酸残基の置換によるT細胞刺激活性の変化の測定）を用いて決定し、T細胞レセプターとの相互作用に必須であることが示されたそれらのアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換し、抗原特異的にT細胞の刺激活性をアレルギー炎症を抑制する方向（T細胞反応性の増大、リンホカインの産生パターンの変化又はアネルギー等）に制御することができる。例えば、ヒトのアレルギーモデルにおいて、スギ花粉Cry j 1のT細胞エピトープペプチド上のT細胞認識部位のアミノ酸1個を他のアミノ酸に（399番目のThrをValに）置換したアナログペプチドは、T細胞増殖反応及びIL-4産生量は野生型ペプチドと差はなかったが、IgE抗体産生を抑制するIFN- γ の産生量は増加したとの報告がある（Ikagawa, S. et al.: J. Aller. Clin. Immunol. 97, 54-64, 1996）。さらに、HLAクラスII分子の結合モチーフは、1～2個のアミノ酸を介して飛び石状に配列する3～5個のアミノ酸残基からなっており、これらが数種類の特定のアミノ酸である場合にペプチドはHLAクラスII分子に結合することが明らかになっている（Matsushita, S. et al.: J. Exp. Med. 180: 877-883, 1994）ことから、本発明のT細胞エピトープペプチドの、HLAクラスII分子との相互作用に必須なアミノ酸残基を公知技術を用いて決定し当該アミノ酸残基（HLAクラスII分子結合モチーフ）を他のアミノ酸に置換し、アレルギー炎症を抑制することができる。さらに又、本発明のT細胞エピトープペプチドの溶解度を増し、治療もしくは予防効果又は安定性を増大させる目的で当該ペプチドを改変することができる。これらの改変には、アミノ酸置換、欠失又は付加等が含まれる。

【0022】

さらに本発明において、好適なT細胞エピトープペプチドは、IgE抗体に結合しないか、結合するにしても当該ペプチドが由来する天然のヒノキ花粉アレルゲンがIgE抗体に結合するよりも実質的に低い程度で結合する。

【0023】

本発明のT細胞エピトープペプチドは、少なくとも7アミノ酸残基を含むことが好ましい。また、これらの領域をカテプシン又はトリプシンなどの酵素切断に感受性のArg-Arg又はLys-Lysなどのリンカーによりつないで、抗原提示細胞によるプロセッシングに対する感受性を増加させ、一つ以上のT細胞エピトープを含むペプチドの部分を生成させることができる。又、本発明のT細胞エピトープは、Cry j 1 T細胞エピトープペプチド（特表平8-502163号公報）及び／又はCry j 2 T細胞エピトープペプチド（特開平8-47392号公報）等の他のペプチドと組み合わせて用いることができる。

【0024】

本発明の少なくとも一つのT細胞エピトープを含むペプチドは、ヒノキ花粉アレルゲンに感受性の個人及び／又はヒノキとスギ花粉アレルゲンの両者に感受性の個人に投与したとき、その個人のアレルゲンに対するアレルギー応答を調節することができるので、ペプチド免疫療法に有用である。特に本発明のT細胞エピトープペプチドとスギ花粉T細胞エピトープペプチドを組み合わせたものは、スギ・ヒノキに代表される春期樹木花粉症患者に対するペプチド免疫療法に有用である。

【0025】

本発明のT細胞エピトープペプチドは、ヒノキ花粉アレルゲン又は当該アレルゲンと免疫学的に交差反応性のある他の樹木花粉により引き起こされる花粉症診断用の試薬としても用いることができる。すなわち、患者末梢血リンパ球に当該ペプチドを約 $0.1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $1\text{ mg}/\text{ml}$ 好ましくは約 $1\text{ }\sim\text{ }300\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 加え、1週間培養した後、 $[^3\text{H}]$ チミジンのリンパ球への取り込み量を測定し評価することにより、花粉症の診断が可能となる。又、本発明のT細胞エピトープペプチドはT細胞機能、T細胞増殖又はこれらの組み合わせを評価するのにも用いることもできる。

【0026】

本発明のT細胞エピトープペプチドを組換えDNA技術で合成する場合は、当該ペプチドをコードする配列を有する核酸で形質転換した宿主細胞をその細胞に適した培地で培養し、その培養上清から又は宿主細胞から当該ペプチドを当業者に公知の技術を用いて合成することができる。宿主としては、大腸菌、酵母、哺乳動物細胞等を用いることができる。

【0027】

本発明のT細胞エピトープペプチドを、花粉症患者に対するペプチド免疫療法に使用する場合は、製薬上許容しうる適当な希釈剤、担体と組み合わせて使用することができる。花粉症患者は、ヒノキ花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応性を示すスギ花粉アレルゲン患者を含む。投与方法には、注射（皮下、静脈注射等）、点眼、点鼻、経口、吸入、経皮などの簡便な方法を用いることができ、投与量としては、注射による場合は、当該ペプチドを1投与量単位当たり、好ましくは約1μg～30mg、さらに好ましくは約20μg～10mgを投与する。

【0028】

【実施例】

以下に本発明の実施例を記載するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【0029】

【実施例1】 オーバーラップペプチドの合成

ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1（配列番号：1）及びCha o 2（配列番号：2）のアミノ酸配列に基づいて、それぞれ10残基のオーバーラップ部分を含む20残基のオーバーラップペプチドを、ペプチド合成機PSSM-8（島津製作所）を用いて、Fmoc法で合成した。オーバーラップペプチドは、Cha o 1では35種類（図1）、Cha o 2では51種類であった（図5）。合成したペプチドは全てODSカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で精製し、純度は90%以上であった。精製物はLASERMAT 2000（Finnigan MAT Ltd.）でそれぞれの分子量を確認した。

【0030】

【実施例2】 組換えタンパクの大腸菌での発現

ヒノキ花粉抗原をコードするCha o 1のcDNA又はCha o 2のcDNAがクローン化

されているプラスミドDNA（特願平6-335089号）から、PCRによりcDNAを増幅し、末端に制限酵素の認識部位を付与した。このDNA断片をヒスチジンタグ結合タンパク発現ベクターpQE9に挿入し、大腸菌M15(pREP4)の形質転換を行った。アンピシリン耐性のクローンについて導入遺伝子の発現をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。発現タンパクはNi-NTAアガロース親和性カラムで精製した。

【0031】

〔実施例3〕 T細胞ラインの樹立

Cha o 1に関するT細胞ラインの樹立は次のようにして行った。即ち、8名のAlla STAT（日本DPCコーポレーション）ヒノキ陽性患者の末梢血由来リンパ球をフィコールーパック（Ficoll-Paque）比重遠心法を用いて分離した。このリンパ球（ 2×10^6 個）を2mlの同一患者の血漿（10%）又はヒトAB型血清（20%、萬邦通商）添加RPMI1640培地（GIBCO社）に懸濁し、実施例2で得られた10～30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の組換えCha o 1又は実施例1で得られたオーバーラップペプチド混合物（0.01～1 μM ）と共に24穴プレート上で3～10日間培養した（37°C、CO₂インキュベーター、TABAI社）。Cha o 1刺激を受けて活性化されたT細胞が顕微鏡下で確認できた時点で5U/mlのIL-2（ベーリンガー・マンハイム社）を添加し、一晩培養した。翌日からは20U/mlのIL-2、10%又は20%ヒトAB型血清添加RPMI1640培地で毎日培地を交換しながら約10日間培養し、増殖したT細胞ラインの特異性を調べた後、一部を凍結保存した。また、Cha o 2に関するT細胞ラインの樹立は6名のヒノキ花粉症患者について同様の方法で行った。

【0032】

〔実施例4〕 抗原提示細胞の樹立

抗原提示細胞としてEBウイルス（Epstein-Barr virus、EBV）をBリンパ球に感染させトランスフォーメーションを引き起こさせたリンパ芽球様細胞株（B細胞株）を樹立し使用した。即ち、まずEBV産生B-95-8細胞（マーモセット、ATCC CRL1612）を非効化ウシ胎児血清（FCS、GIBCO社製）20%添加RPMI1640培地で培養し、その培養上清を0.22 μm 滅菌用フィルターでろ過し、-80°Cで凍結保存した。次にヒノキ花粉症患者のリンパ球（ 2×10^6 個）にEBV液1mlを加え37°Cで30分感

染させた。EBV感染細胞を2回洗浄後、サイクロスボリン（サンド薬品）最終濃度200ng/ml添加20% FCS-RPMI1640培地で約20日間培養した。細胞塊が肉眼で観察できるようになった後は20% FCS-RPMI 1640培地でさらに約20日間培養し、その後使用するまで細胞を凍結保存した。

【0033】

【実施例5】 T細胞エピトープペプチドの同定

実施例4で樹立した培養B細胞株を50μg/mlのマイトマイシンC（サンド薬品）で30分処理するか、又はX線照射（50gray）した後、RPMI1640培地で4回洗浄した。このB細胞を96穴プレートに播種（10,000個/ウェル）した後、Cha o 1に関しては最終濃度10μg/mlの組換え体、Cha o 2に関しては最終濃度1μMのオーバーラップペプチド混合物を加えた。（対照群としては最終濃度10μg/mlの溶連菌細胞壁抗原（SCW）、最終濃度10μg/mlのキャンディダ・アルビカンス（*Candida Al bicans*）抗原（CA）、最終濃度1μg/mlのツベルクリン（Tuberculin）抗原（PPD）を加えた。）その後B細胞株を樹立した同一患者のT細胞ライン（20,000個/ウェル）を各ウェルに播種し48時間培養後0.5μCi [³H]チミジンをウェルに添加しさらに16時間培養した。細胞をセルハーベスター（ベルトールド）を用いてガラスフィルター上に捕集後、細胞内に取り込まれた [³H]チミジン量を液体シンチレーションカウンターにて測定し、細胞増殖応答を確認した。

【0034】

T細胞ラインがCha o 1又はCha o 2に特異的に増殖応答することを確認後、実施例3で樹立されたT細胞ラインを用いて上記と同様の手法で各オーバーラップペプチド（最終濃度1μM）に対するT細胞ラインの増殖応答を見た。オーバーラップペプチドに対するT細胞ラインの増殖応答の平均刺激係数出現頻度及びそれから算出された重要度指標の結果を図1及び図5示す。

【0035】

【発明の効果】

本発明はヒノキ花粉主要アレルゲンであるCha o 1の少なくとも一つのT細胞エピトープを含むペプチド及びCha o 2の少なくとも一つのT細胞エピトープを含むペプチドを提供する。さらに本発明は、当該ペプチドと免疫学的にT細胞交差反

応性を示す他の樹木花粉のペプチド断片を含む。これらのペプチドは、スギ・ヒノキ花粉に代表される春期樹木花粉症のペプチド免疫療法に有用である。

【0036】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：354

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Asp	Asn	Pro	Ile	Asp	Ser	Cys	Trp	Arg	Gly	Asp	Ala	Asn	Trp	Asp	Gln
5														15	
Asn	Arg	Met	Lys	Leu	Ala	Asp	Cys	Ala	Val	Gly	Phe	Gly	Ser	Ser	Ala
		20							25				30		
Met	Gly	Gly	Lys	Gly	Gly	Ala	Phe	Tyr	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Asp	Asp
		35							40				45		
Asp	Pro	Val	Asn	Pro	Ala	Pro	Gly	Thr	Leu	Arg	Tyr	Gly	Ala	Thr	Arg
		50				55							60		
Glu	Arg	Ser	Leu	Trp	Ile	Ile	Phe	Ser	Lys	Asn	Leu	Asn	Ile	Lys	Leu
		65				70			75				80		
Asn	Met	Pro	Leu	Tyr	Ile	Ala	Gly	Asn	Lys	Thr	Ile	Asp	Gly	Arg	Gly
									85		90		95		
Ala	Glu	Val	His	Ile	Gly	Asn	Gly	Gly	Pro	Cys	Leu	Phe	Met	Arg	Thr
									100		105		110		
Val	Ser	His	Val	Ile	Leu	His	Gly	Leu	Asn	Ile	His	Gly	Cys	Asn	Thr
									115		120		125		
Ser	Val	Ser	Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Ser	Glu	Ala	Ser	Gly	Val	Val	Pro
									130		135		140		
Val	His	Ala	Gln	Asp	Gly	Asp	Ala	Ile	Thr	Met	Arg	Asn	Val	Thr	Asp
									145		150		155		160
Val	Trp	Ile	Asp	His	Asn	Ser	Leu	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Gly	Leu	Val

165	170	175
Asp Val Thr Leu Ala Ser Thr Gly Val Thr Ile Ser Asn Asn His Phe		
180	185	190
Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu Gly His Ser Asp Ile Tyr Ser		
195	200	205
Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro		
210	215	220
Asn Ala Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr Gly Leu Ile His Val		
225	230	235
240		
Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Ser Ile Tyr Ala Ile Gly Gly Ser		
245	250	255
Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser Phe Thr Ala Pro Asn		
260	265	270
Asp Ser Asp Lys Lys Glu Val Thr Arg Arg Val Gly Cys Glu Ser Pro		
275	280	285
Ser Thr Cys Ala Asn Trp Val Trp Arg Ser Thr Gln Asp Ser Phe Asn		
290	295	300
Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Asn Glu Gly Thr Asn Ile		
305	310	315
320		
Tyr Asn Asn Asn Glu Ala Phe Lys Val Glu Asn Gly Ser Ala Ala Pro		
325	330	335
Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu Thr Cys Ile Leu Ser Lys Pro		
340	345	350
Cys Ser		

配列番号：2

配列の長さ：514

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Met Gly Met Lys Phe Met Ala Ala Val Ala Phe Leu Ala Leu Gln Leu
 5 10 15

Ile Val Met Ala Ala Ala Glu Asp Gln Ser Ala Gln Ile Met Leu Asp
 20 25 30

Ser Asp Ile Glu Gln Tyr Leu Arg Ser Asn Arg Ser Leu Lys Lys Leu
 35 40 45

Val His Ser Arg His Asp Ala Ala Thr Val Phe Asn Val Glu Gln Tyr
 50 55 60

Gly Ala Val Gly Asp Gly Lys His Asp Ser Thr Glu Ala Phe Ala Thr
 65 70 75 80

Thr Trp Asn Ala Ala Cys Lys Lys Ala Ser Ala Val Leu Leu Val Pro
 85 90 95

Ala Asn Lys Lys Phe Phe Val Asn Asn Leu Val Phe Arg Gly Pro Cys
 100 105 110

Gln Pro His Leu Pro Phe Lys Val Asp Gly Thr Ile Val Ala Gln Pro
 115- 120 125

Asp Pro Ala Arg Trp Lys Asn Ser Lys Ile Trp Leu Gln Phe Ala Gln
 130 135 140

Leu Thr Asp Phe Asn Leu Met Gly Thr Gly Val Ile Asp Gly Gln Gly
 145 150 155 160

Gln Gln Trp Trp Ala Gly Gln Cys Lys Val Val Asn Gly Arg Thr Val
 165 170 175

Cys Asn Asp Arg Asn Arg Pro Thr Ala Ile Lys Ile Asp Tyr Ser Lys
 180 185 190

Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Thr Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His
 195 200 205

Leu Val Phe Gly Glu Cys Glu Gly Val Lys Ile Gln Gly Leu Lys Ile

210	215	220
Lys Ala Pro Arg Asp Ser Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe Ala		
225	230	235
Ser Lys Arg Phe His Ile Glu Lys Cys Val Ile Gly Thr Gly Asp Asp		
245	250	255
Cys Ile Ala Ile Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Thr Ile Lys Asp Leu		
260	265	270
Ile Cys Gly Pro Gly His Gly Ile Ser Ile Gly Ser Leu Gly Arg Asp		
275	280	285
Asn Ser Arg Ala Glu Val Ser His Val His Val Asn Arg Ala Lys Phe		
290	295	300
Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser		
305	310	315
Gly Leu Ala Ser Tyr Ile Thr Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile Asn Ser		
325	330	335
Glu Asn Pro Ile Leu Ile Asn Gln Phe Tyr Cys Thr Ser Ala Ser Ala		
340	345	350
Cys Gln Asn Gln Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Gly Val Thr Tyr Lys		
355	360	365
Asn Ile His Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ile Gln Leu Met Cys		
370	375	380
Ser Asp Ser Val Pro Cys Thr Gly Ile Gln Leu Ser Asn Val Ser Leu		
385	390	395
Lys Leu Thr Ser Gly Lys Pro Ala Ser Cys Val Asp Lys Asn Ala Arg		
405	410	415
Gly Phe Tyr Ser Gly Arg Leu Ile Pro Thr Cys Lys Asn Leu Arg Pro		
420	425	430
Gly Pro Ser Pro Lys Glu Phe Glu Leu Gln Gln Gln Pro Thr Thr Val		
435	440	445

Met Asp Glu Asn Lys Gly Ala Cys Ala Lys Gly Asp Ser Thr Cys Ile
450 455 460

Ser Leu Ser Ser Ser Pro Pro Asn Cys Lys Asn Lys Cys Lys Gly Cys
465 470 475 480

Gln Pro Cys Lys Pro Lys Leu Ile Ile Val His Pro Asn Lys Pro Gln
485 490 495

Asp Tyr Tyr Pro Gln Lys Trp Val Cys Ser Cys His Asn Lys Ile Tyr
500 505 510

Asn Pro

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1におけるT細胞エピトープペプチド及び当該ペプチドの重要度指数を示す図である。

【図 2】

Cha o 1のオーバーラップペプチド（#1-1～#1-28）を示す図である。

【図 3】

Cha o 1のオーバーラップペプチド（#1-29～#1-35）を示す図である。

【図 4】

Cha o 1のT細胞エピトープを含むペプチドを示す図である。

【図 5】

ヒノキ花粉アレルゲンCha o 2におけるT細胞エピトープペプチド及び当該ペプチドの重要度指数を示す図である。

【図 6】

Cha o 2のオーバーラップペプチド（#2-1～#1-27）を示す図である。

【図 7】

Cha o 2のオーバーラップペプチド（#2-28～#1-51）を示す図である。

【図 8】

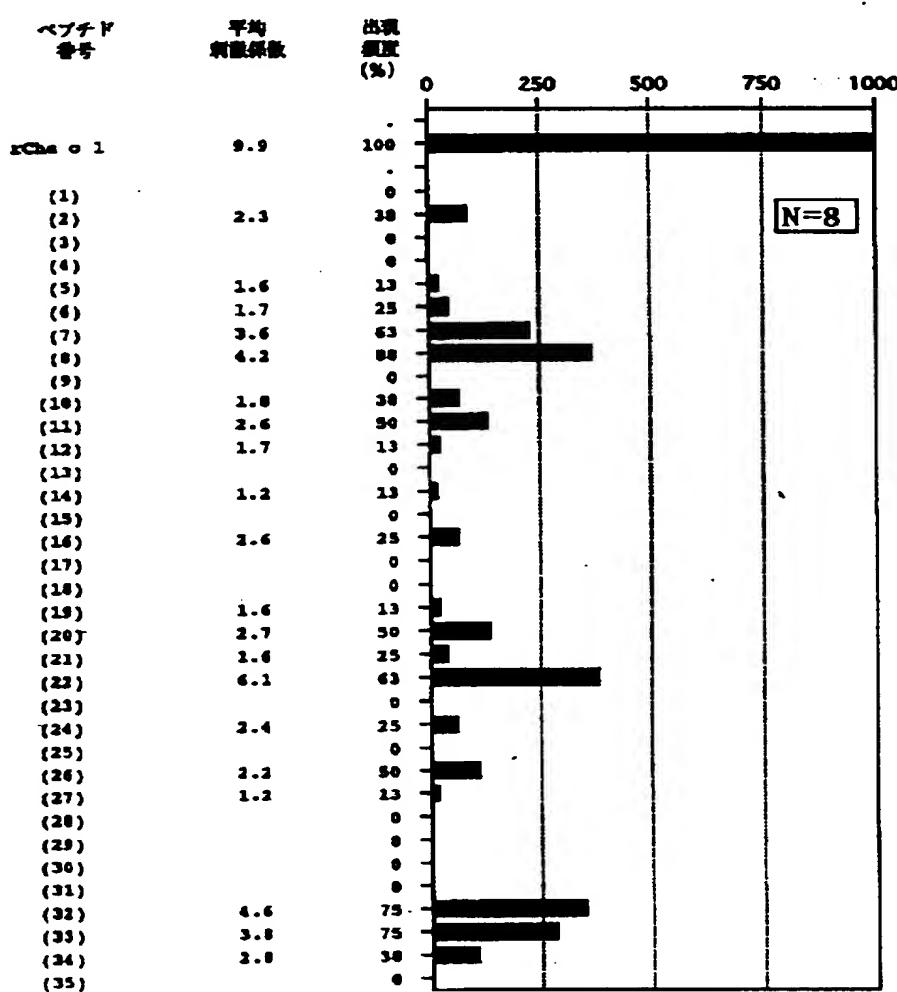
Cha o 2のT細胞エピトープを含むペプチドを示す図である。

【書類名】

図面

【図1】

重要度指數（平均刺激係数×出現頻度（%））



【図2】

#1-1(1-20). D N P I D S C W R G D A N W D Q N R H K
 #1-2(11-30). D A N W D Q N R M K L A D C A V G F G S
 #1-3(21-40). L A D C A V G F G S S A M G G K G G A F
 #1-4(31-50). S A M G G K G G A F Y T V T S S D D D P
 #1-5(41-60). Y T V T S S D D D P V N P A P G T L R Y
 #1-6(51-70). V N P A P G T L R Y G A T R E R S L W I
 #1-7(61-80). G A T R E R S L W I I F S K N L N I K L
 #1-8(71-90). I F S K N L N I K L N M P L Y I A G N K
 #1-9(81-100). N M P L Y I A G N K T I D G R G A E V H
 #1-10(91-110). T I D G R G A E V H I G N G G P C L F M
 #1-11(101-120). I G N G G P C L F M R T V S H V I L H G
 #1-12(111-130). R T V S H V I L H G L N I H G C N T S V
 #1-13(121-140). L N I H G C N T S V S G N V L I S E A S
 #1-14(131-150). S G N V L I S E A S G V V P V H A Q D G
 #1-15(141-160). G V V P V H A Q D G D A I T M B N V T D
 #1-16(151-170). D A I T M R N V T D Y W I D H N S L S D
 #1-17(161-180). V W I D H N S L S D S S D G L V D V T L
 #1-18(171-190). S S D G L V D V T L A S T G V T I S N N
 #1-19(181-200). A S T G V T I S N N H F F N H H K V M L
 #1-20(191-210). H F F N H H K V M L L G H S D I Y S D D
 #1-21(201-220). L G H S D I Y S D D K S M K V T V A F N
 #1-22(211-230). K S M K V T V A F N Q F G P N A G Q R M
 #1-23(221-240). Q F G P N A G Q R M P R A R Y G L I H V
 #1-24(231-250). P R A R Y G L I H V A N N N Y D P W S I
 #1-25(241-260). A N N N Y D P W S I Y A I G G S S N P T
 #1-26(251-270). Y A I G G S S N P T I L S E G N S F T A
 #1-27(261-280). I L S E G N S F T A P N D S D K K E V T
 #1-28(271-290). P N D S D K K E V T R R V G C E S P S T

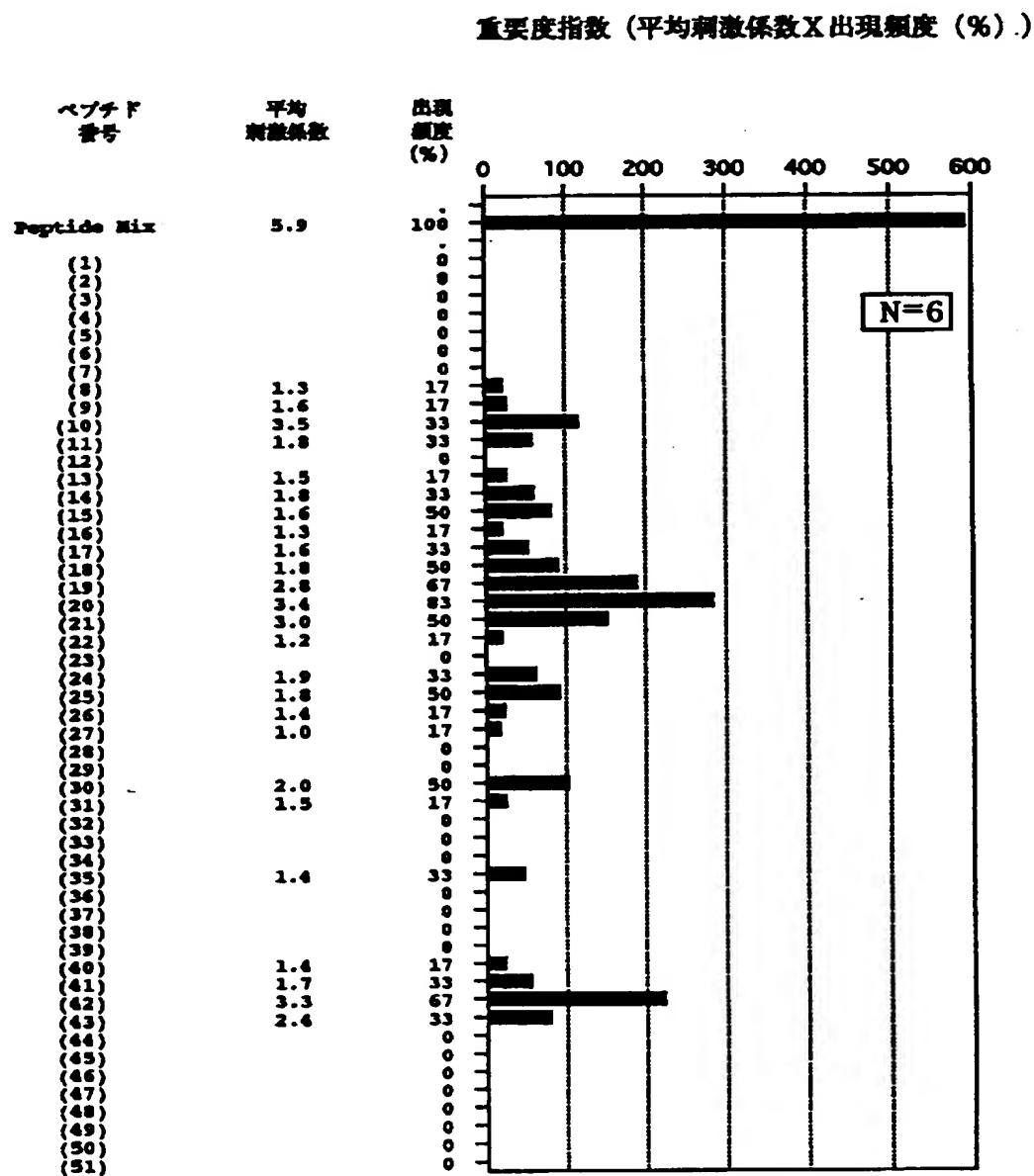
【図3】

#1-29(281-300). R R V G C E S P S T C A N W V W R S T Q
#1-30(291-310). C A N W V V W R S T Q D S F N N G A Y F V
#1-31(301-320). D S F H N G A Y F V S S G K N E G T N I
#1-32(311-330). S S G K N E G T N I Y N N N E A F K V E
#1-33(321-340). Y N N N I A F K V E N G S A A P Q L T K
#1-34(331-350). N G S A A P Q L T K N A G V L T C I L S
#1-35(341-354). N A G V L T C I L S K P C S

【図4】

#1-2(11-30). D A N W D Q N R M K L A D C A V G F G S
 #1-5(41-60). Y T V T S S D D D P V N P A P G T L R Y
 #1-6(51-70). V N P A P G T L R Y G A T R E R S L W I
 #1-7(61-80). G A T R E R S L W I I F S K N L N I K L
 #1-8(71-90). I F S K N L N I K L N M P L Y I A G N K
 #1-10(91-110). T I D G R G A E V H I G N G G P C L F M
 #1-11(101-120). I G N G G P C L F M R T V S H V I L H G
 #1-12(111-130). R T V S H V I L H G L N I H G C N T S V
 #1-14(131-150). S G N V L I S E A S G V V P V H A Q D G
 #1-16(151-170). D A I T M R N V T D V W I D H N S L S D
 #1-19(181-200). A S T G V T I S N N H F F N H H K V M L
 #1-20(191-210). H F F N H H K V M L L G H S D I Y S D D
 #1-21(201-220). L G H S D I Y S D D K S M K V T V A P N
 #1-22(211-230). K S M K V T V A F N Q F G P N A G Q R M
 #1-24(231-250). P R A R Y G L I H V A N N N Y D P W S I
 #1-26(251-270). Y A I G G S S N P T I L S E G N S F T A
 #1-27(261-280). I L S E G H S F T A P N D S D K K E V T
 #1-32(311-330). S S G K N E G T N I Y N N N E A F K V E
 #1-33(321-340). Y N N N E A F K V E N G S A A P Q L T K
 #1-34(331-350). N G S A A P Q L T K N A G V L T C I L S

【図5】



【図6】

#2-1(1-20). M G N K F M A A V A F L A L Q L I V M A
 #2-2(11-30). F L A L Q L I V M A A A E D Q S A Q I M
 #2-3(21-40). A A E D Q S A Q I M L D S D I E Q Y L R
 #2-4(31-50). L D S D I E Q Y L R S M R S L K K L V H
 #2-5(41-60). S N R S L K K L V H S R H D A A T V F N
 #2-6(51-70). S R H D A A T V F N V E Q Y G A V G D G
 #2-7(61-80). V E Q Y G A V G D G K H D S T E A F A T
 #2-8(71-90). K H D S T E A F A T T W N A A C K K A S
 #2-9(81-100). T W N A A C K K A S A V L L V P A N K K
 #2-10(91-110). A V L L V P A N K K F F V N N L V F R G
 #2-11(101-120). F F V N N L V F R G P C Q P H L P F K V
 #2-12(111-130). P C Q P H L P F K V D G T I V A Q P D P
 #2-13(121-140). D G T I V A Q P D P A R W K N S K I W L
 #2-14(131-150). A R W K N S K I W L Q F A Q L T D F N L
 #2-15(141-160). Q F A Q L T D F N L H G T G V I D G Q G
 #2-16(151-170). M G T G V I D G Q G Q Q W A G Q C K V
 #2-17(161-180). Q Q W W A G Q C K V V N G R T V C N D R
 #2-18(171-190). V N G R T V C N D R N E P T A I K I D Y
 #2-19(181-200). N R P T A I K I D Y S K S V T V K E L T
 #2-20(191-210). S K S V T V K E L T L M N S P E F H L V
 #2-21(201-220). L M N S P E F H L V F G E C E G V K I Q
 #2-22(211-230). F G E C E G V K I Q G L K I K A P R D S
 #2-23(221-240). G L K I K A P R D S P N T D G I D I F A
 #2-24(231-250). P N T D G I D I F A S K R F H I E K C V
 #2-25(241-260). S K R F H I E K C V I G T G D D C I A I
 #2-26(251-270). I G T G D D C I A I G T G S S N I T I K
 #2-27(261-280). G T G S S N I T I K D L I C G P G H G I

【図7】

#2-28(271-290). D L I C G P G H G I S I G S L G R D N S
 #2-29(281-300). S I G S L G R D N S R A E V S H V H V N
 #2-30(291-310). R A E V S H V H V N R A K F I D T Q N G
 #2-31(301-320). R A K F I D T Q N G L R I K T W Q G G S
 #2-32(311-330). L R I K T W Q G G S G L A S Y I T Y E N
 #2-33(321-340). G L A S Y I T Y E N V E N I N S E N P I
 #2-34(331-350). V E M I N S E N P I L I N Q F Y C T S A
 #2-35(341-360). L I N Q F Y C T S A S A C Q N Q R S A V
 #2-36(351-370). S A C Q N Q R S A V Q I Q G V T Y K N I
 #2-37(361-380). Q I Q G V T Y K N I H G T S A T A A A I
 #2-38(371-390). H G T S A T A A A I Q L M C S D S V P C
 #2-39(381-400). Q L M C S D S V P C T G I Q L S N V S L
 #2-40(391-410). T G I Q L S N V S L K L T S G K P A S C
 #2-41(401-420). K L T S G K P A S C V D K N A R G F Y S
 #2-42(411-430). V D K N A R G F Y S G R L I P T C K N L
 #2-43(421-440). G R L I P T C K N L R P G P S P K E F E
 #2-44(431-450). R P G P S P K E F E L Q Q Q P T T V M D
 #2-45(441-460). L Q Q Q P T T V M D E N K G A C A K G D
 #2-46(451-470). E N K G A C A K G D S T C I S L S S S P
 #2-47(461-480). S T C I S L S S S P P N C K N K C K G C
 #2-48(471-490). P N C K N K C K G C Q P C K P K L I I V
 #2-49(481-500). Q P C K P K L I I V H P N K P Q D Y Y P
 #2-50(491-510). H P N K P Q D Y Y P Q K W V C S C H N K
 #2-51(501-514). Q K W V C S C H N K I Y N P

【図8】

\$2-8(71-90). KHDSTEAFATTWNAACKKAS
 \$2-9(81-100). TWNAACKKASAVLLVPANXK
 \$2-10(91-110). AVLLVPANKKFFVNVLVFRG
 \$2-11(101-120). FFVNVLVFRGPCQPHLPFKV
 \$2-13(121-140). DGTIVAQPDPARWKNSKIWL
 \$2-14(131-150). ARWKNSKIWLQFAQLTDFNL
 \$2-15(141-160). QFAQLTDFNLMGTGVIDGQG
 \$2-16(151-170). MGTGVIDGQGQQWAGQCKIV
 \$2-17(161-180). QQWAGQCKVVNGRTVCNDR
 \$2-18(171-190). VNGRTVCNDRNRPATAIKIDY
 \$2-19(181-200). MRPTAIKIDYSKSVTVKELT
 \$2-20(191-210). SKSVTVKELTLMNSPEFHLV
 \$2-21(201-220). LMNSPEFHLVFGECCEGVKIQ
 \$2-22(211-230). FGECCEGVKIQGLKIKAPRDS
 \$2-24(231-250). PNTDGIIDIFASKRFHIEKCV
 \$2-25(241-260). SKRFHIEKCVIGTGDDCIAI
 \$2-26(251-270). IGTGDDCIAIGTGSSNITIK
 \$2-27(261-280). GTGSSNITIKDLICGPGHGI
 \$2-30(291-310). RAEVSHVHVNVRAKFIDTQNG
 \$2-31(301-320). RAKFIDTQNGLRIKTWQGGS
 \$2-35(341-360). LINQFYCTSASACQNQRSAV
 \$2-40(391-410). TGIQLSNVSLKLTSGKPASC
 \$2-41(401-420). KLTSGKPASCVDKNARGFYS
 \$2-42(411-430). VDKNARGFYSGRLIPTCKNL
 \$2-43(421-440). GRLIPTCKNLRPGPSPKEFE

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒノキ花粉と交差反応性を持つスギ花粉症患者も含めた春期樹木花粉症患者に対するペプチド免疫療法に有用なT細胞エピトープペプチドを提供することを課題とする。

【解決手段】 ヒノキ花粉症患者から樹立したT細胞ラインを、ヒノキ花粉アレルゲンの一次構造をカバーするオーバーラップペプチドで刺激することにより、ヒノキ花粉アレルゲン分子上のT細胞エピトープ部位を同定した。本発明のペプチドは、春期樹木花粉症に対するペプチド免疫療法や、春期樹木花粉症の診断に有用である。

【選択図】 図1

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

＜認定情報・付加情報＞

【特許出願人】

【識別番号】 000006138

【住所又は居所】 東京都中央区京橋2丁目3番6号

【氏名又は名称】 明治乳業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県つくば市千現2-1-6 つくば研究支援センター-C A-4

【氏名又は名称】 清水 初志

出願人履歴情報

識別番号 [000006138]

1. 変更年月日 1990年 8月14日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都中央区京橋2丁目3番6号
氏 名 明治乳業株式会社